

UNIVERSITE DE GENEVE
Section de médecine dentaire

FACULTE DE MEDECINE
Professeur G. CIMASONI

FACULTE DES SCIENCES
Professeur A. LINDER

ENZYMES LYSOSOMALES DANS LES PRODUITS DE RINCAGE
DE LA REGION PARODONTALE MARGINALE
AU COURS DE LA GINGIVITE EXPERIMENTALE CHEZ L'HOMME

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

Pierre BAEHNI

de

Genève

Thèse N° 315

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

UNIVERSITE DE GENEVE
Section de médecine dentaire

FACULTE DE MEDECINE
Professeur G. CIMASONI

FACULTE DES SCIENCES
Professeur A. LINDER

ENZYMES LYSOSOMALES DANS LES PRODUITS DE RINCAGE
DE LA REGION PARODONTALE MARGINALE
AU COURS DE LA GINGIVITE EXPERIMENTALE CHEZ L'HOMME

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

Pierre BAEHNI

de

Genève

Thèse N° 315

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur G. Cimasoni, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 31 octobre 1974

Le doyen :
William Geisendorf

Thèse No 315



Nous prions le professeur G. Cimasoni de trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour l'intérêt et l'enthousiasme qu'il a manifestés pendant l'élaboration de notre travail.

Nous remercions vivement le professeur A. Linder qui, avec tant d'amabilité et de compétence, a apporté son précieux concours à la réalisation de la partie statistique.

Nous adressons nos vifs remerciements :

- aux étudiants qui se sont patiemment prêtés aux expériences;
- à Mademoiselle E. Andersen et à Madame I. Condacci qui ont effectué avec beaucoup de soin, les analyses biochimiques;
- à Mademoiselle M. Schneeberger de l'Institut de Statistique mathématique pour les calculs statistiques et la réalisation précise des schémas;
- à Madame M. Rénier qui a dactylographié le texte;
- à Monsieur F. Blanc pour son aide dans la construction de l'appareillage;
- au professeur-assistant J.M. Meyer et au docteur J. Matter pour leurs précieux conseils.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A MA FAMILLE

1. Introduction

La plupart des auteurs s'accordent à dire que les micro-organismes de la plaque dentaire jouent un rôle primordial comme facteur étiologique de la gingivite et de la parodontite (10,20,31).

LOE et coll. en 1965 (20), ont démontré qu'il est toujours possible de provoquer une gingivite chez des sujets ayant cessé toute activité d'hygiène buccale. D'autre part, il résulte de leurs travaux que l'accumulation de la plaque bactérienne précède l'apparition de la gingivite et donc qu'elle en est probablement la cause. En 1966, THEILADE et coll. (31), dans leur étude, se sont surtout attachés aux changements bactériologiques intervenant dans la flore de la plaque dentaire : la flore normale qui se compose habituellement de coques Gram positifs est remplacée à la fin de la période de non-brossage par des coques Gram négatifs, des vibrions et des spirochètes.

Les différents constituants de la plaque dentaire se comportent vis-à-vis de l'hôte comme des agents irritants ce qui probablement provoque, au niveau de la gencive, des changements inflammatoires.

ZACHRISSON (36) a étudié les changements histologiques intervenant au niveau de la gencive, lors de l'éclosion d'une gingivite. Les résultats histologiques montrent une augmentation de l'infiltrat inflammatoire dans le conjonctif adjacent à l'épithélium jonctionnel. L'infiltrat se compose principalement d'éléments monocytaires qui traduisent donc une phase chronique de gingivite. Les résultats de ces différents travaux ont été confirmés récemment chez le singe, par KRYGIER et coll. (17).

Nous savons que les bactéries de la plaque ne peuvent traverser la barrière épithéliale du sillon gingivo-dentaire (6); les composants biochimiques et les produits métaboliques des micro-organismes doivent donc jouer un rôle prépondérant dans la phase initiale des parodontopathies.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le phénomène d'inflammation et de destruction tissulaire caractérisant la parodontite. Etant donné que les produits de la plaque bactérienne sont nombreux, ces mécanismes sont variés. Ainsi les bactéries peuvent être actives :

- 1) par leurs toxines agissant soit directement sur les éléments cellulaires de la muqueuse (substances cytotoxiques), soit comme antigènes, provoquant l'apparition d'anticorps (18,25).
- 2) par la production de nombreuses enzymes pouvant utiliser comme substrats divers constituants de la muqueuse ou bien qui activent le complément dans les réactions immunologiques (27).
- 3) en libérant des substances favorisant la chémotaxie des

leucocytes(4,14) et stimulant le phénomène de phagocytose qui, on le sait, est accompagné d'une libération d'enzymes lysosomales(13,34). ATTSTROM (2), ATTSTROM et EGELBERG (3) ont montré une augmentation du nombre absolu des leucocytes au cours d'une gingivite. L'étude de BABOOLAL, POWELL et PROPHEET (5) a démontré qu'il y a également une dégénérescence des éléments leucocytaires et parallèlement une augmentation de la concentration d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Enfin TYNELIUS-BRATHALL et ATTSTROM (32) ont réalisé des travaux chez le chien. Ils ont démontré lors de la gingivite, une augmentation de la concentration en phosphatase acide, en hyaluronidase et en protéase qui a été accompagnée d'une augmentation proportionnelle du nombre de leucocytes. Il n'est donc pas impossible que les éléments cellulaires qui apparaissent au cours de l'inflammation, en libérant leurs enzymes lysosomales, jouent un rôle dans la destruction du tissu parodontal. Des enzymes lysosomales pourraient également provenir de cellules épithéliales qui desquament (12). Ces enzymes sont présentes dans le fluide gingival qui apparaît au niveau du sillon gingivo-dentaire pendant l'inflammation.

Certaines études, dont celle de BANG et CIMASONI (7) ont montré que la composition de ce fluide est typique d'un exsudat inflammatoire. Une corrélation positive a d'ailleurs été démontrée entre la gravité de l'inflammation et la quantité de fluide que l'on peut prélever en un temps donné (9,33).

Parmi les nombreuses enzymes lysosomales (11), on trouve la bêta-glucuronidase et la cathepsine-D. Or une corrélation positive a été démontrée entre la concentration de ces deux enzymes dans le fluide gingival et la gravité de la parodontite (8,33).

Comme nous l'avons vu plus haut, les enzymes que l'on trouve au niveau de la région parodontale marginale, peuvent provenir soit des bactéries soit des lysosomes. Si on est à peu près certain du rôle nocif des enzymes bactériennes (25,28), celui des enzymes libérées à partir des lysosomes des cellules conjonctives ou épithéliales reste encore assez mal connu. Le but de ce travail a été de suivre l'activité de certaines enzymes d'origine lysosomale s'accumulant au niveau de la région gingivale marginale pendant une gingivite expérimentale chez l'homme.

2. Matériel et méthodes

Sept étudiants mâles, âgés de 22 à 24 ans, ont participé à cette étude. Ils ont été choisis en raison de leur excellent état bucco-dentaire, du faible nombre d'obturations, de leur hygiène et de leur attitude positive envers les problèmes de prévention.

L'étude longitudinale a porté sur 42 jours, dont une phase pré-expérimentale de 9 jours, au début de laquelle les dents des sujets ont été soigneusement nettoyées et polies par une hygiéniste dentaire. Pendant cette période pré-expérimentale, les étudiants ont continué à maintenir une hygiène buccale parfaite. Ils ont été examinés quotidiennement, ce qui a permis d'établir des valeurs de base au point de vue clinique et biochimique

Au jour 0, marquant le début de la phase expérimentale, les sept sujets ont cessé toute mesure d'hygiène au maxillaire supérieur seulement. La période de non-brossage a duré 22 jours. Les sujets ont été examinés à intervalles irréguliers (jour +2 +5 +12 +20 +21 +22). Le 22ème jour, après que des changements inflammatoires au niveau gingival ont été observés, les sujets ont repris le brossage, mais les examens se sont poursuivis pendant 11 jours (jour +23 +27 +29 +33), jusqu'à ce que les valeurs cliniques redeviennent ce qu'elles étaient au jour 0. L'expérience était alors terminée.

Lors de chaque examen, les indices cliniques d'inflammation gingivale et de plaque ont été relevés; le débit de fluide gingival a été mesuré à l'aide de languettes de papier-filtre; (un status clinique complet a donc été dressé, permettant de suivre le développement de la gingivite chez ces sujets) et enfin des lavages de la région gingivale marginale ont été pratiqués pour les analyses chimiques.

Des photos en couleur de l'arcade supérieure (région vestibulaire antérieure), ont également été prises, au jour 0 +5 +12 +22 +23 +27 +33.

2.1. Eléments cliniques de l'étude

2.1.1. Indice d'inflammation gingivale

Le degré d'inflammation de la gencive a été mesuré selon la méthode de LOE et SILNESS (19) :

0 = gencive normale

1 = légère inflammation : léger changement de couleur
léger oedème
pas de saignement au sondage

- 2 = inflammation moyenne : rougeur
oedème
saignement au sondage
- 3 = inflammation marquée : rougeur et oedème important
tendance au saignement spontané

Quatre mesures (mésiale, distale, vestibulaire et palatine) ont été effectuées pour chaque dent de tout le maxillaire supérieur.

Finalement le score total divisé par le nombre de mesures a donné l'indice gingival du sujet.

2.1.2. Indice de plaque

L'accumulation de dépôts au niveau du collet de la dent a été appréciée selon la méthode de LOE et SILNESS (19) :

0 = pas de plaque

1 = un film de plaque adhère à la gencive marginale et sur la surface adjacente de la dent.

La plaque n'est détectée qu'en promenant la sonde sur la surface dentaire.

2 = accumulation modérée qui peut être vue à l'oeil nu.

3 = abondance de dépôts mous sur la gencive marginale et sur la surface correspondante de la dent.

Quatre mesures (mésiale, distale, vestibulaire et palatine) ont été effectuées pour chaque dent.

Le total des mesures, divisé par le nombre de surfaces examinées, a donné l'indice de plaque du sujet.

2.1.3. Mesure du débit du fluide gingival

Le débit de fluide gingival, reflétant le degré d'inflammation gingivale, a été mesuré selon la technique intra-crêviculaire standardisée par VALAZZA et coll. (33)

L'exsudat inflammatoire ou fluide gingival, a été collecté à l'aide de languettes de papier-filtre (Schleicher et Schuell No 595) de 1,5 mm de largeur, insérées dans le sillon gingivo-dentaire, à une profondeur de 1 mm. Les prélèvements ont été effectués sur les 4 dents du bloc incisif (12, 11, 21, 22). Les languettes de papier-filtre ont été insérées sur trois faces seulement de chaque dent (mésiale, vestibulaire et distale), en évitant toute contamination par la salive. Pour cela les dents avaient été isolées par des cotons, puis légèrement séchées au jet d'air. Les languettes étaient contenues dans des micro-éprouvettes de plastique (Beckmann); elles n'étaient sorties que pour le prélèvement, et aussitôt renfermées hermétiquement pour éviter toute évaporation. Les micro-éprouvettes ont été pesées

avant et après la collection du fluide. La différence de poids, divisée par le temps de collection, a donné le débit, exprimé en mg/min.

2.1.4. Lavage de la région gingivale marginale

Des séries d'analyses ont été faites dans le produit de lavage de la région gingivale marginale du maxillaire supérieur.

L'appareil décrit par OPPENHEIM (24) mais modifié par SUDAN (30) a été utilisé pour l'obtention de ces lavages.

En résumé, l'appareillage a été préparé comme suit : chez chaque sujet, une empreinte du maxillaire supérieur a été prise en alginate, à l'aide d'un porte-empreinte individuel. Sur un modèle très précis de l'arcade supérieure, coulé en plâtre dur, la zone du sillon gingivo-dentaire a été recouverte de cire. Une gouttière en résine autopolymérisante a été construite sur ce modèle. Elle recouvrait toute la région maxillaire et se terminait par des bords mous s'appliquant parfaitement aux zones de réflexion de la gencive, au fond du vestibule et au niveau de la région du "post-dam". Le sillon créé le long de la jonction gingivo-dentaire était relié à 4 tubes de polyvinyl. Les lavages ont été effectués en faisant circuler, à l'aide d'une pompe, 6 ml de solution physiologique. La durée de chaque lavage a été de 5 minutes, à la fin desquelles les 6 ml ont été recueillis pour les analyses chimiques.

2.2. Analyses biochimiques dans les produits de lavages

2.2.1. Détermination de l'activité de la phosphatase acide

Comme il a été décrit en détail par STEUBE (29), l'activité enzymatique de la phosphatase acide a été déterminée dans les produits de lavages par une méthode fluorimétrique (26). Le substrat fluorescent était le 4-méthyl-umbelliféryl-dihydrogène-phosphate, qui se transforme, après incubation avec l'enzyme à un pH de 5.0, en 4-méthyl-umbelliférone.

La concentration en méthyl-umbelliférone a été déterminée grâce à un fluorimètre Aminco en utilisant une longueur d'onde de 364 mμ pour la lumière excitante et de 448 mμ pour la lumière émise. Pour ce faire, la fluorescence a été déterminée au niveau de l'échantillon à analyser et d'un échantillon "blanc". La différence entre ces deux mesures a été ensuite reportée sur une courbe standard, donnant la concentration en méthyl-umbelliférone en fonction de l'intensité de fluorescence. L'activité enzymatique a donc été exprimée en μg de méthyl-umbelliférone libérés par heure et par ml de solution.

2.2.2. Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline

La méthode fluorimétrique a également été utilisée pour la détermination de l'activité de la phosphatase alcaline (STEUBE, 29). Le substrat était toujours le 4-méthyl-umbelliféryl-dihydrogène-phosphate, mais l'incubation a été faite cette fois à un pH de 8,8.

Après arrêt de l'incubation par alcalinisation, l'activité enzymatique a été déterminée au fluorimètre en utilisant les mêmes longueurs d'onde. L'activité enzymatique a été exprimée en μg de méthyl-umbelliférone libérés par heure et par ml de solution.

2.2.3. Détermination de l'activité de la bêta-glucuronidase

L'activité de la bêta-glucuronidase a également été déterminée par fluorimétrie en utilisant du 4-méthyl-umbelliféryl- β -D-glucuronide-hydrate comme substrat (VALAZZA et al, 33 ; STEUBE, 29).

2.2.4. Détermination de l'activité de la cathepsine-D

La méthode d'ANSON (1), telle qu'elle a été décrite en détail par STEUBE (29), a été utilisée pour la détermination de l'activité de l'enzyme protéolytique cathepsine-D. Cette méthode préconise l'emploi d'hémoglobine comme substrat à un pH de 3,5 avec un temps d'incubation qui, pour nos besoins était d'une durée de 23 heures.

2.2.5. Détermination de la concentration en protéines totales

La concentration en protéines totales a été déterminée par la méthode de LOWRY (21).

2.2.6. Détermination de la concentration en acide desoxyribonucléique (DNA)

Une modification de la méthode fluorimétrique de KISSANE et ROBINS (16) a été utilisée pour déterminer la concentration en DNA dans les produits de lavage (STEUBE, 29).

Cette méthode est basée sur les propriétés de fluorescence du produit de réaction entre le DNA et l'acide 3,5 diamino-benzoïque.

3. Résultats

Tous les résultats, concernant soit les observations cliniques, soit les observations biochimiques, seront présentés sous forme de graphiques, donnant les variations du paramètre à l'étude (ordonnée) en fonction du temps (abscisse).

Le but de l'analyse statistique était de constater si les valeurs obtenues durant la période expérimentale s'écartaient de façon significative de celles de la période préliminaire. Il a été nécessaire de comparer individuellement les données de chaque jour de la période expérimentale à la moyenne de la période préliminaire, étant donné que le changement de régime se manifestait vraisemblablement peu à peu.

On a donc calculé la moyenne de toutes les valeurs observées durant la période préliminaire, disons m_p , et la moyenne des valeurs observées le jour j de la période expérimentale désignée par m_j . L'analyse statistique doit permettre de constater si m_j s'écartait significativement de m_p . A cet effet on a calculé une quantité t par la formule

$$t = \frac{m_j - m_p}{s_d} \quad (1)$$

où s_d est l'erreur standard de la différence $m_j - m_p$.

L'erreur standard s_d est le produit de deux facteurs. Le premier facteur tient compte de la variabilité des valeurs observées durant la période préliminaire; le second dépend du nombre d'observations faites durant la période préliminaire et au jour j . On peut écrire pour s_d^2 :

$$s_d^2 = s^2 \left(\frac{1}{N_p} + \frac{1}{N_j} \right) \quad (2)$$

où

N_p = nombre d'observations durant la période préliminaire.

N_j = nombre d'observations durant le jour j .

Quant à s^2 , il mesure la variabilité au cours de la période préliminaire et voici comment il a été déterminé. Il s'agissait de trouver la variabilité des valeurs observées d'un jour à l'autre pendant la période préliminaire. Quant aux différences des données entre un sujet et l'autre, qui sont d'ailleurs importantes, elles ne doivent pas être retenues pour calculer s^2 .

Nous avons obtenu s^2 par une analyse de variance simple qui permet justement d'évaluer la variabilité entre jours à l'intérieur des sujets (LINDER, 37).

On peut donc calculer la valeur t pour chaque jour j de la période expérimentale et constater si la différence entre m_j et m_p est significative, en comparant le t calculé à un t_p choisi avec un certain risque d'erreur, qu'on fixe souvent à 5 pour cent.

Au lieu de procéder à ces calculs pour chaque jour, une méthode graphique a été utilisée. Vu que le nombre de valeurs obtenu chaque jour de la période expérimentale était en principe constant et égal à 7 on peut facilement indiquer deux limites (limites fiduciaires ou limites de confiance) situées en dessous et en dessus de la moyenne m_p de la période préliminaire. Ces limites ont été désignées par l_1 et l_2 respectivement : tout point situé au delà des limites de l_1 ou l_2 indique que la différence entre la moyenne journalière m_j et la moyenne m_p de la période préliminaire est significative.

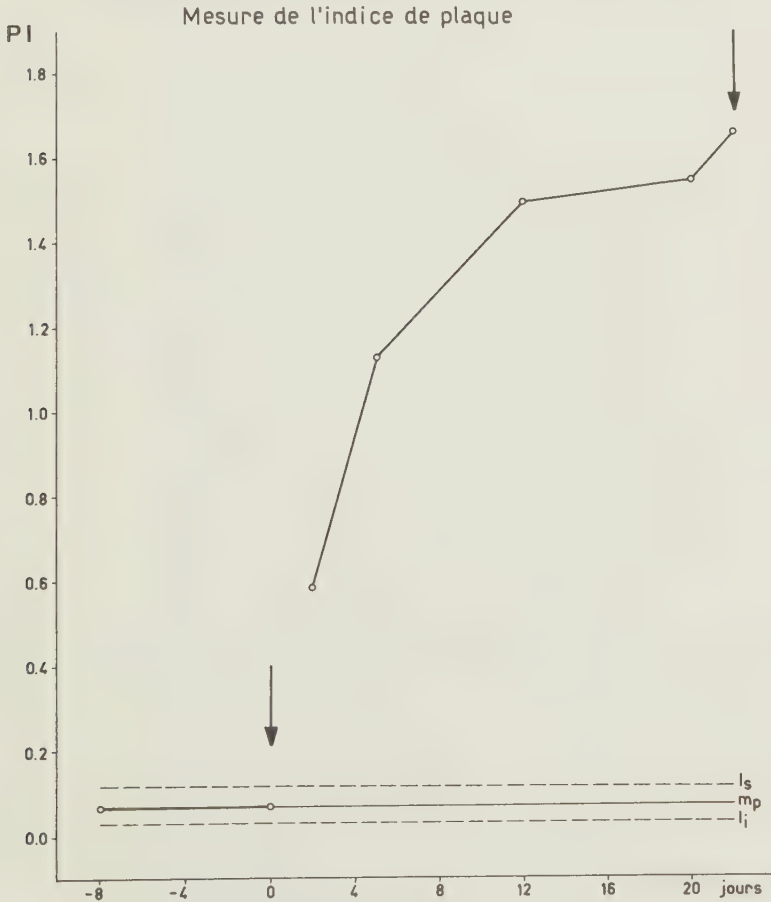
Pour que l'analyse statistique esquissée ci-dessus soit valable, et en particulier que la variabilité s^2 entre jours à l'intérieur des sujets donne une vue correcte de la réalité, il est indispensable de s'assurer que la variabilité entre jours soit égale pour les différents sujets, mise à part de fluctuations dues au hasard.

Une analyse plus approfondie a montré que cette homogénéité de la variabilité était présente pour les valeurs cliniques. Pour toutes les autres quantités mesurées on a obtenu cette homogénéité en prenant les logarithmes des valeurs observées.

Les calculs indiqués ci-dessus et spécifiés par les formules (1) et (2) ont donc été exécutés pour les valeurs cliniques directement pour les données observées, et pour les mesures de l'activité des différentes enzymes pour les logarithmes des valeurs observées.

3.1. Résultats cliniques

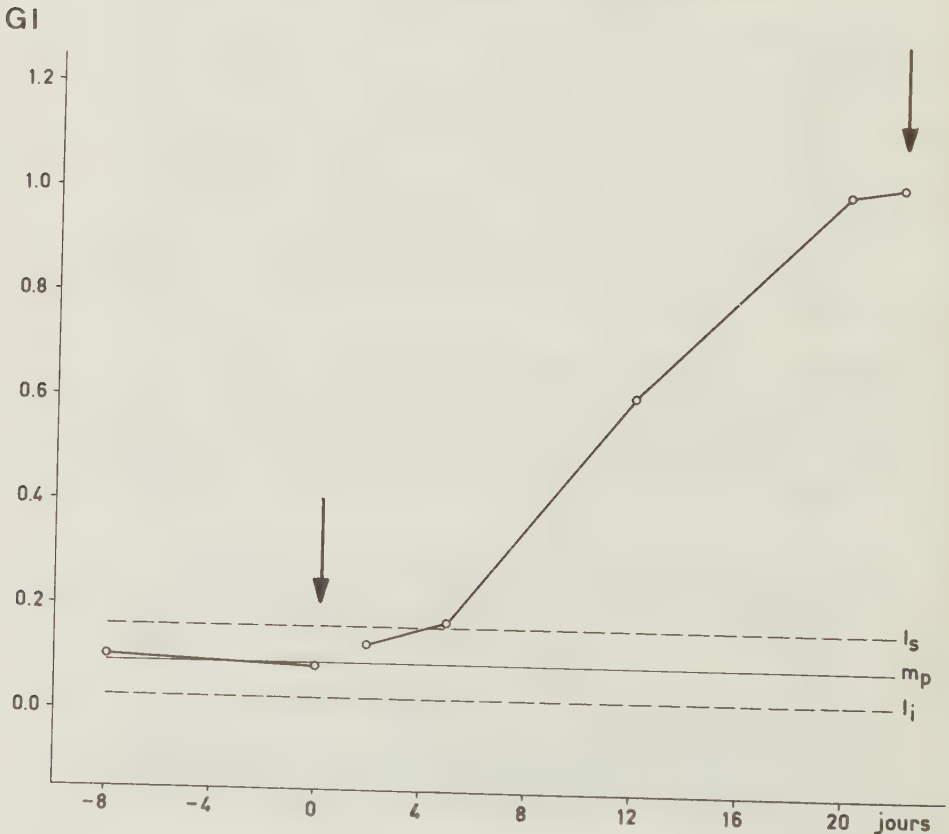
Le graphique No 1 montre l'augmentation de l'indice de plaque pendant l'expérience. Les valeurs moyennes de l'indice de plaque des sept sujets ont été reportées sur l'axe des ordonnées; l'axe des abscisses indique les jours. Les flèches marquent le début (jour 0) et la fin (jour 22) de la période de non brossage. m_p représente la moyenne des valeurs observées au cours de la période pré-expérimentale; l_s et l_i les limites de confiance. L'accumulation de plaque a commencé immédiatement après l'arrêt du brossage au jour 0 et a atteint un plateau au 12e jour environ. L'indice de plaque a donc augmenté d'une façon nette et significative pendant la période expérimentale.



Graphique No 1

Le graphique No 2 représente la variation de l'indice d'inflammation gingivale au cours de l'étude. L'axe des ordonnées donne les valeurs moyennes des mesures de l'indice d'inflammation gingivale chez les sept sujets. L'axe des abscisses indique les jours. On remarque que pendant la période préliminaire l'indice d'inflammation gingivale a été très stable. Cet indice a augmenté d'une façon significative seulement à partir du 5e jour pour atteindre son maximum au 22e jour, marquant la fin de la période de non-brossage.

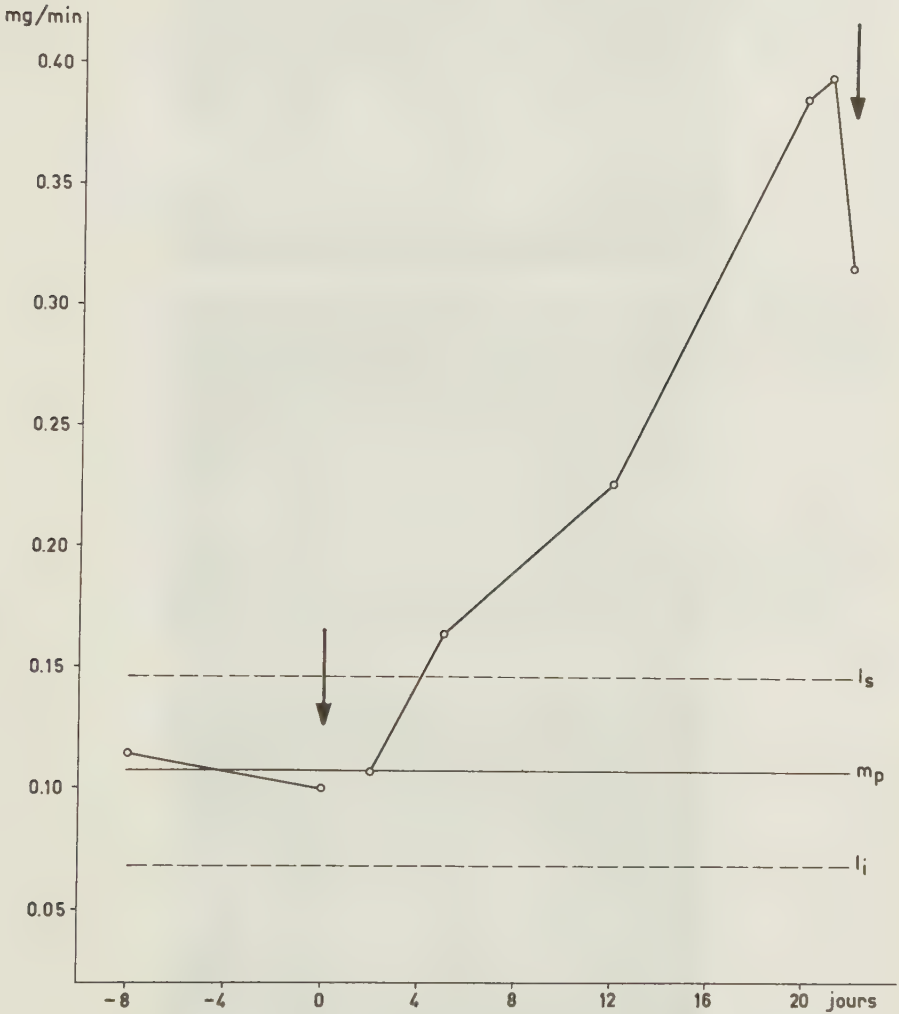
Mesure de l'indice gingival d'inflammation



Graphique No 2

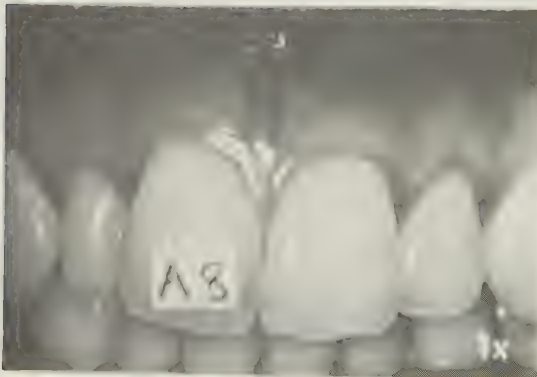
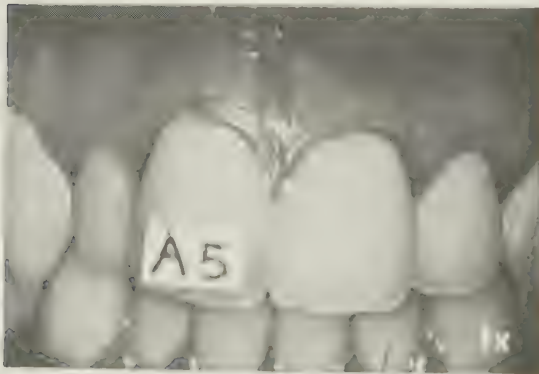
Le graphique No 3 représente les mesures du débit de fluide gingival collecté sur papier-filtre au niveau du bloc incisif supérieur suivant la technique de mesure quantitative décrite sous "matériel et méthodes". Le débit en mg/min a été indiqué sur l'axe des ordonnées. L'axe des abscisses donne les jours. Le débit de fluide gingival a nettement augmenté dès le 5e jour de la période de non-brossage, indiquée entre les deux flèches.

Mesure du débit de fluide gingival



Graphique No 3

Un exemple typique de gingivite expérimentale est illustré par les figures 1, 2 et 3 reproduisant la région incisive supérieure chez un des sujets respectivement au début (fig. 1), à la fin de la période de non-brossage (fig. 2) et 11 jours après avoir repris le brossage (fig. 3).



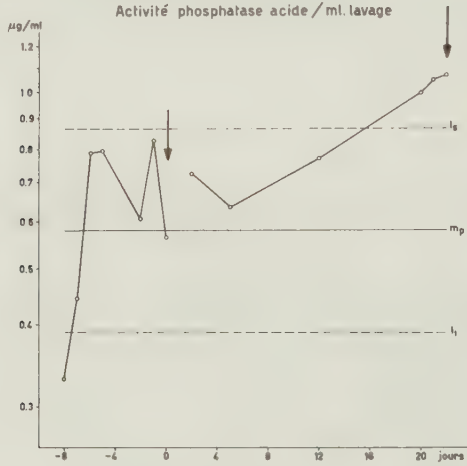
Légendes des figures

- Fig. 1 Sujet P.L., au jour 0
La gencive est parfaitement saine; on distingue très bien la gencive marginale, rose pâle et lisse ainsi que la gencive attachée caractérisée par son aspect "granité".
- Fig. 2 Sujet P.L., au jour 22 (fin de la période de non-brossage).
L'accumulation de plaque est abondante; elle est visible au niveau du collet de toutes les dents. On remarque les signes évidents d'inflammation de la gencive marginale au niveau du collet de la dent 21.
- Fig. 3 Sujet P.L., au jour 33 (11 jours après la reprise du brossage).
La gencive est de nouveau saine comme elle l'était au début de l'étude; la plaque a complètement disparu dès la reprise du brossage.

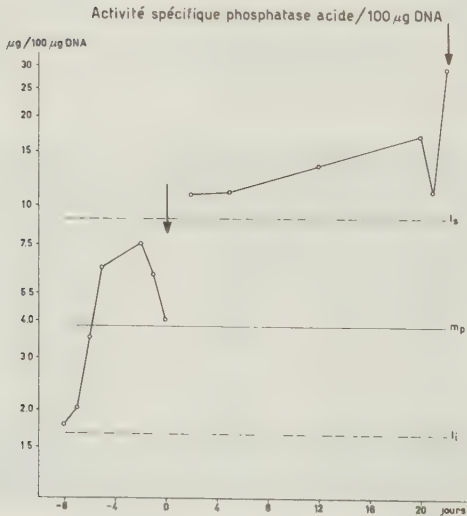
3.2. Résultats des analyses biochimiques

3.2.1. Phosphatase acide

Les graphiques No 4 et No 5 représentent l'activité enzymatique de la phosphatase acide exprimée d'une part par ml de lavage, d'autre part par 100 μg de DNA. L'axe des ordonnées indique en échelle logarithmique, l'activité de la phosphatase acide en $\mu\text{g}/\text{ml}$ et en $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ DNA. Il faut remarquer qu'en dépit de la grande variabilité journalière pendant la phase pré-expérimentale, l'activité enzymatique a augmenté d'une façon significative.



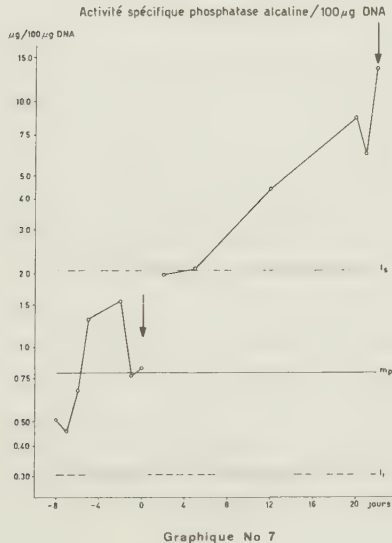
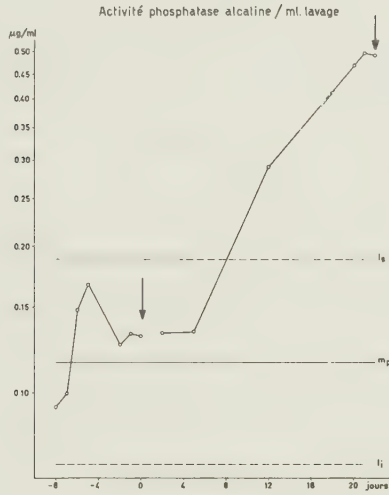
Graphique No 4



Graphique No 5

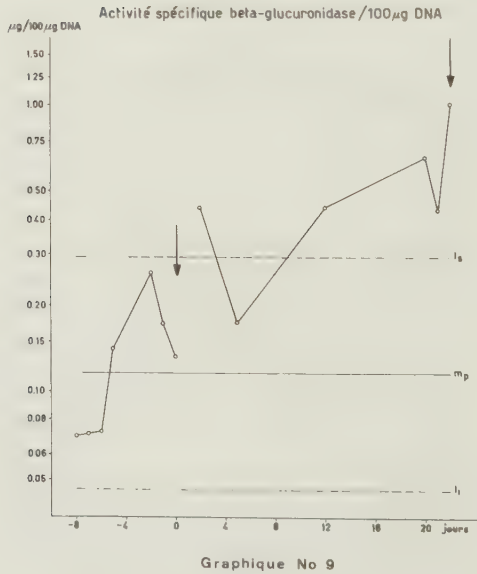
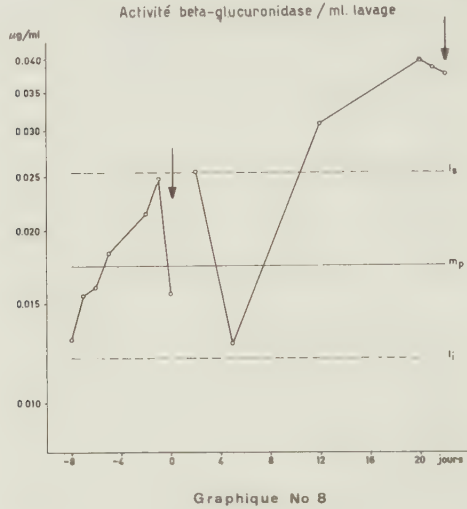
3.2.2. Phosphatase alcaline

Le graphique No 6 montre l'activité de la phosphatase alcaline exprimée par ml de lavage et sur le graphique No 7 par 100 μg de DNA. L'axe des ordonnées donne les valeurs de l'activité enzymatique en logarithme. L'axe des abscisses donne les jours. L'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline est nette dans les deux cas pendant la période de non-brossage.



3.2.3. Béta-glucuronidase

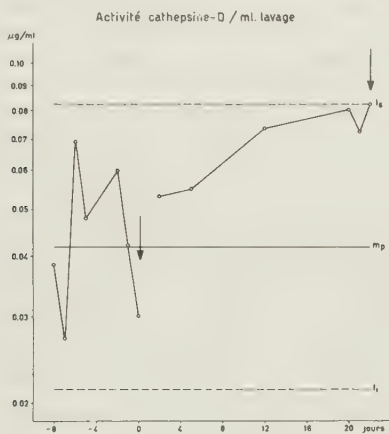
Les graphiques No 8 et No 9 se rapportent aux variations de l'activité de la béta-glucuronidase. L'activité de cette enzyme exprimée par ml en échelle logarithmique, montre une augmentation significative dépassant la limite supérieure l_s ; l'augmentation de l'activité de la béta-glucuronidase exprimée par 100 μg DNA, est également significative.



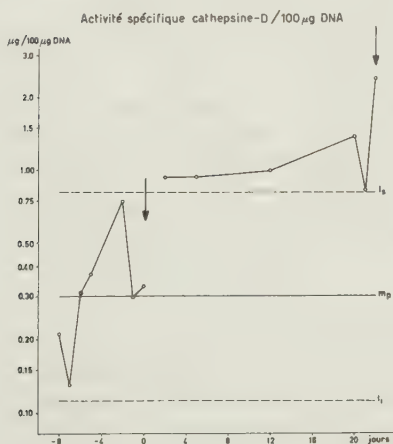
3.2.4. Cathepsine-D

Le graphique No 10 montre les variations de l'activité de la cathepsine-D par ml de lavage. L'activité enzymatique exprimée en μg par ml, est notée sur l'axe des ordonnées en échelle logarithmique. Nous voyons que les variations journalières pendant la période préliminaire sont importantes. Le maximum d'activité de l'enzyme ne dépasse jamais la limite supérieure de confiance (l_s) au cours de la période expérimentale. L'augmentation de l'activité de la cathepsine-D exprimée par ml n'est donc statistiquement pas significative.

Le graphique No 11 montre l'activité de la cathepsine-D en fonction du DNA. L'augmentation d'activité dans ce cas est réelle et significative.



Graphique No 10



Graphique No 11

4. Discussion

=====

Une analyse statistique a été effectuée pour les résultats de notre étude car les variations des paramètres biochimiques sont importantes. Cette analyse a permis d'étudier si les variations ont été significatives et si une augmentation réelle a pu être notée au cours de l'expérience. La représentation graphique des résultats montre que toutes les valeurs comprises entre les limites de confiance l_s et l_i sont, dans notre étude, des valeurs physiologiques; tous les paramètres aussi bien cliniques que biochimiques, à l'exception de la cathepsine-D exprimée par millilitre, ont dépassé la norme limitée par l_s .

Les éléments cliniques de notre étude confirment les résultats de LOE et coll. (20) ainsi que ceux de THEILADE et coll. (31). En effet, dès l'arrêt du brossage, l'indice reflétant l'accumulation de plaque, a augmenté très rapidement; mais l'inflammation ne s'est développée qu'à partir du cinquième jour pour n'atteindre un indice de 1 que le vingtième jour. De même le retour des paramètres cliniques à leurs valeurs initiales s'est également fait avec un certain décalage : l'indice de plaque est revenu proche de 0 dès la reprise du brossage alors que l'inflammation n'a disparu qu'après 11 jours. Ces résultats confirment donc qu'une relation de cause à effet doit exister entre l'accumulation de plaque et le développement d'une phase aiguë de gingivite chez l'homme.

Dans la présentation des résultats biochimiques, nous avons exprimé l'activité enzymatique soit par millilitre de lavage soit par rapport à une quantité donnée (100 ug) de DNA. Le nombre de millilitres de lavage n'a pas été constant pour chaque prélèvement; la concentration et l'activité enzymatique mesurée ont donc varié en fonction de la quantité de millilitres récoltés; c'est la raison pour laquelle il a été nécessaire de calculer l'activité enzymatique par rapport au DNA qui nous a servi de valeur de référence. De cette façon le rapport activité enzymatique/DNA traduit une activité spécifique réelle même si le nombre de millilitres varie. Ce DNA mesuré dans les produits de lavage provient des cellules épithéliales qui ont desquamé et des leucocytes; mais il est probable, comme l'a démontré STEUBE (29), que le DNA d'origine bactérienne interfère et que la mesure du DNA n'est pas le reflet exact de la population cellulaire. On peut malgré tout admettre qu'elle en est une mesure approximative et indirecte. Dans ces conditions, il est intéressant de noter que l'activité spécifique a augmenté pour tous les enzymes; cela exprimerait qu'il y a une production et une libération d'enzymes lysosomaux à partir des cellules.

La période post-expérimentale n'a pas été représentée sur les graphiques. Pendant cette période, qui a duré 11 jours, nous nous sommes efforcés à ce que les paramètres retournent à leurs valeurs initiales; cela a été le cas pour tous les indices cliniques, mais pas pour toutes les valeurs biochimiques dans les conditions de la présente recherche. Il y a probablement différentes raisons. Nous pensons que d'une part la période post-expérimentale a été trop courte : en effet il faut remarquer que l'indice gingival d'inflammation et le débit de fluide gingival ne sont revenus aux valeurs pré-expérimentales que 11 jours après la reprise du brossage, soit exactement à la fin de l'expérience. Bien qu'au niveau gingival, plus aucun signe d'inflammation n'était décelable, il est possible que l'activité biochimique n'était pas encore celle d'une gencive parfaitement saine. Nous pensons en outre, que le nombre de sujets qui a passé de 7 à 4 pour les trois derniers examens de la période post-expérimentale, a rendu l'interprétation des résultats statistiques, pour cette période, moins évidente.

Comme MERGENHAGEN et SNYDERMAN (22) l'ont fait remarquer, le tissu parodontal est un excellent modèle pour l'étude de l'inflammation, car plus facile d'accès que, par exemple, une articulation. D'ailleurs, on pourrait mettre en parallèle l'inflammation gingivale et celle que l'on observe au niveau d'une articulation. On sait, par exemple, que le liquide synovial provenant d'une articulation enflammée contient plus d'enzymes lysosomaux que celui d'une articulation saine, et il est probable que ces enzymes s'attaquent aux complexes protéinaux-polysaccharidiques de la substance fondamentale du cartilage de revêtement. De plus, les cellules de la synovie montrent au microscope électronique, pendant l'inflammation, des images d'anomalies lysosomales. Enfin, il a été possible de provoquer une arthrite par l'injection d'extraits lysosomaux (35). Or différentes études de certaines enzymes, faites par ISHIKAWA et CIMASONI (15), CORNAZ et CIMASONI (12) semblent étayer l'hypothèse lysosomale comme mécanisme possible déclenchant la gingivite. Les travaux de THYNELIUS-BRATHALL et ATTSTRÖM (32), qui ont montré chez le chien une augmentation du nombre de leucocytes parallèlement à une augmentation de la concentration de certaines enzymes lysosomales au cours d'une gingivite, paraissent confirmer ces faits.

Dans cette optique, notre étude paraît montrer une augmentation nette de l'activité de certaines enzymes chez l'homme, mais il n'a pas été possible de démontrer que celle-ci précédait les signes cliniques de la gingivite. Il paraît probable que ces enzymes libérées, à partir des lysosomes, causent des dommages tissulaires, mais la relation directe de cause à effet reste à démontrer.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin.
J. gen. Physiol. 22 : 79-89, 1938.
2. ATTSTROM, R. Presence of leucocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae.
J. Periodont. Res. 5 : 42-47, 1970.
3. ATTSTROM, R. and EGELBERG, J. Presence of leucocytes within the gingival crevices during developing gingivitis in dogs.
J. Periodont. Res. 6 : 110-114, 1971.
4. ATTSTROM, R. and EGELBERG, J. Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices.
J. Periodont. Res. 5 : 48-55, 1971.
5. BABOOLAL, R., POWELL, R.N. and PROPHEET, A.S. Hydrolytic enzymes in developing gingival plaque.
J. Periodont. Res. 41 : 87-92, 1970.
6. BAWN, A.N. Microbial potential in the etiology of periodontal disease.
J. Periodontol. 41 : 603, 1970.
7. BANG, J.S. and CIMASONI, G. Total protein in human crevicular fluid.
J. Dent. Res. 50 : 1683, 1971.
8. BANG, J., CIMASONI, G. and HELD, A.J. Beta-glucuronidase correlated with inflammation in the exudate from human gingiva.
Archs oral Biol. 15 : 445-451, 1970.
9. BRILL, N. and BRONNESTAM, R. Immuno-electrophoretic study of tissue fluid from gingival pockets.
Acta Odont. Scand. 18 : 35-100, 1960.
10. BURNETT, G.W. and SCHERP, H.W. Oral microbiology and infections disease.
3 rd Ed. Williams and Wilkins Co : Baltimore 1968.
11. CIMASONI, G. The crevicular fluid.
Monographs in oral science : Vol. 3, S. Karger-Basel, 1974.

12. CORNAZ, A., CIMASONI, G. and PATAKI, A. Decrease of acid phosphatase activity in the epithelial cells from inflamed gingivae. *Experientia*, 30 : 143-144, 1974.
13. FREEDMAN, H.L., TAICHMAN, N.S. and KEYSTONE, J. Inflammation and tissue injury. II local release of lysosomal enzymes during mixed bacterial infection in the skin of rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125 : 1209-1213, 1967.
14. HELLDEN, L., LINDHE, J., ATTSTROM, R. and SUNDIN, Y. Neutrophil chemotactic factors in gingival crevice material. *Helv. Odont. Acta* 17 : 1-5, 1973.
15. ISHIKAWA, I., CIMASONI, G. and AHMAD-ZADEH, C. Possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis of periodontitis : a study on cathepsin D in human gingival fluid. *Archs oral Biol.* 17 : 111-117, 1972.
16. KISSANE, J.M. and ROBINS, E. The fluorimetric measurement of desoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 233 : 184-188, 1958.
17. KRYGIER, G., GENCO, R.J., MASHIMO, P.A. and HAUSMANN, E. Experimental gingivitis in *Macaca Speciosa* monkeys : clinical, bacteriologic and histologic similarities to human gingivitis. *J. Periodontol.* 44 : 454-463, 1972.
18. LEHNER, T. Cell-mediated immune responses in oral disease : a review. *J. Oral Path.* 1 : 39-58, 1972.
19. LOE, H. The gingival index, the plaque index and the retention index system. *J. Periodontol.* 38 : 610-616, 1967.
20. LOE, H., THEILADE, E. and JENSEN, B. Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.* 36 : 177-187, 1965.
21. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.

22. MERGENHAGEN, S. and SNYDERMAN, R. Periodontal disease :
a model for the study of inflammation.
J. of infection diseases 123 : 676-677, 1971.
23. NORD, C.E. and SÖDER, P.O. Hyaluronidase activity of dental
plaque material from children with healthy
and diseased gingiva.
Odont. Revy 23 : 55-62, 1972.
24. OPPENHEIM, F.G. Preliminary observations on the presence
and origin of serum albumin in human saliva.
Helv. Odont. Acta. 14 : 10-17, 1970.
25. RANNEY, R.R. and ZANDER, H.A. Allergic periodontal disease
in sensitized squirrel monkeys.
J. Periodontol. 41 : 11-21, 1970.
26. ROBINSON, D. and WILLCOX, P. 4-Methylumbelliferyl phosphate
as a substrate for lysosomal acid phosphatase.
Biochem. Biophys. Acta. 191 : 183-186, 19 9
27. SNYDERMAN, R., PHILLIPS, J.R. and MERGENHAGEN, S. E.
Biological activity of complement in vivo :
role of C⁵ in the accumulation of polymorpho-
nuclear leucocytes in inflammatory exudates.
J. Exp. Med. 134 : 1131, 1971.
28. SOCRANSKY, S.S. Relationship of bacteria to the etiology
of periodontal disease.
J. Dent. Res. 49: 203-222, 1970.
29. STEUBE, W. Etude longitudinale de certains composants du
produit de rinçage du sillon gingivo-dentaire.
Thèse no 312 Médecine et Hygiène (1974).
30. SUDAN, J.M. Produits de rinçage de la région parodontale
marginale : étude biochimique.
Thèse Médecine et Hygiène (sous presse).
31. THEILADE, E., WRIGHT, W.H., JENSEN, B. and LOE, H.
Experimental gingivitis in man. II a longitu-
dinal clinical and bacteriological investiga-
tion.
J. Periodont. Res. 1 : 1-13, 1966.
32. TYNELIUS-BRATHALL, G. and ATTSTROM, R. Acid phosphatase,
hyaluronidase and protease in crevices of
healthy and chronically inflamed gingiva in dogs.
J. Dent. Res. 51 : 279-289, 1971.

33. VALAZZA, A. Phosphatase acide, bêta-glucuronidase et cathepsine D dans des microquantités de fluide gingival.
Thèse No 289 Médecine et Hygiène, 1972.
34. WEISSMANN, C. The role of lysosomes in inflammation and disease.
Ann. Rev. Med. 18 : 97-112, 1967.
35. WEISSMANN, G. and THOMAS, L. On mechanism of tissue damage by bacterial endotoxins.
In Bacterial Endotoxins edited by Landy, M. and Brown, W., Rutgers Univ. Press. New Brunswick, 1964.
36. ZACHRISSON, B.V. A histological study of experimental gingivitis in man. J. Periodont. Res. 3 : 293-302, 1968.
37. LINDER, A. Statistische Methoden.
Birkhäuser, Basel, 1964.

